

Az ATP reverzibilis megváltozása vizes oldatban napfény hatására

GARAY KÁROLY és G. FEHÉR IBOLYA

Agrokémiai Kutató Intézet Biokémiai Osztálya, Budapest

Az előző dolgozatban (4) közöltük, hogy a röntgen, az ultraszonikus és ultraviola sugárzás ATP-re vizes oldatban milyen hatást gyakorol. E sugárzások hatására az ATP magasenergiájú foszfáteszter kötéseinek enzimatis hasítási sebessége nagymértékben megnövekedett (ezt nevezzük S-ATP-nek). Ha csak a vizet sugároztuk és a sugárzás kikapcsolása pillanatában vagy később bizonyos időpontokban adtuk hozzá a megfelelő mennyiségű ATP-t 50 γ /ml végkoncentrációig és ezután azonnal vizsgáltuk az enzimatis hasíthatóságot, azt tapasztaltuk, hogy a legtöbb esetben a hasíthatóság kifejezetten gátolódott (ezt neveztük R-ATP-nek). Az ultraviola abszorpciós spektrogramok azt mutatták, hogy az ATP molekula szerkezetében lényeges változás történt a sugárzások alatt az ATP-be felvett energia hatására. Szabályszerűen a hasíthatóság fokozódásakor mindig extinkció-csökkenés, a hasíthatóság lassúbbodásakor mindig extinkció-emelkedés jelentkezett. Hogy itt valóban az eszterkötések lazításáról van szó, azt részben a savas hidrolízissel, részben pedig enzimesen lehasított és a Fiske-Subarow módszerrel kimutatott szervesetlen foszformennyiségei is bizonyították. Ugyanis, ahol a viszkoziméteres görbe hirtelen emelkedett, ennek az emelkedésnek egy bizonyos pontján a lehasított foszformennyiség lényegesen több volt, mint ott, ahol a viszkoziméteres görbe még alig emelkedett. További kísérletek annak bizonyítására irányulnak, hogy az ATP szerkezetében történik-e változás. Az alábbi kísérletek ennek a mechanizmusnak kiderítésére irányultak.

Már a vizsgálatok kezdetén (1949) megfigyeltük, hogy az ATP oldat elkészítése után rögtön felvett hasítási görbe bizonyos idő múlva napfényen, illetve sötétben ugyanazon hőfokon állva lényegesen megváltozott (4). Azonban a kontrol ATP-hez viszonyított sugárzásos enzimhasítási értékeknél mindig tekintetbe vettük ezt a körülményt. Vagyis a sugárzott ATP enzimatis hasítási és egyéb vizsgálatainál vele egyidőben az ugyanolyan körülmények között tartott — kivéve magát a sugárzást — ATP oldat hasíthatóságát is minden esetben vizsgáltuk és az ekkor felvett kontrolértékhez mértük a sugárzott ATP hasíthatósági viszonyait. Ennek a jelenségnek nagy fontosságot tulajdonítva még 1951-ben beható vizsgálat alá vettük ezt a kérdést: nevezetesen mi lesz az eredmény, ha különböző koncentrációjú ATP oldatokat ugyanazon a hőfokon napfényen, illetve sötétben tartunk.

Kísérleti módszerek

1. A kísérletekben használt adenozintrifoszfát (ATP) minden esetben a Kőbányai Gyógyszergyár által készített 71,3—74,5 $\frac{0}{10}$ -os ATP nátriumsó volt. Ebből steril körülmények között készítettük a különböző koncentrációjú ATP oldatokat. A különböző koncentrációjú oldatok egyik fele napfényre, a másik fele sötétbe került. Az ATP oldatokat tartalmazó edény vastagfalú kémcső, illetve legtöbb esetben becsiszolt üveg dugós lombik volt. A dugókat paraffinnal zártuk

el. Mind a napfényen, mind a sötétben álló oldatok mindig jeges vízben, üvegcádban álltak, illetve a sötétben állók teljesen fénytűrő dobozban jeges vízben állva kerültek jégsekrénybe. Az enzimhasítási és az ultraviola abszorpciós vizsgálatokhoz minden egyes ATP hígításból egyidőben készítettük a megfelelő 50—50 γ /ml ATP oldatot. Ennek egyik felét az enzimhasítási vizsgálatokra, másik felét pedig ugyanakkor az abszorpciós spektrogramok felvételére használtuk. Az ATP oldatokat minden esetben kétszer üvegből desztillált vízben készítettük. Az enzimhasítási viszkozimetriás vizsgálatokat és a spektrogramok felvételét az esetek többségében egyidőben végeztük. Éjjelre a fényen álló oldatokat 500 wattos izzóval 1 méter távolságból világítottuk. A napfény megvilágítással párhuzamosan több esetben sötét szobában ugyancsak 500 wattos izzóval 1 méterről megvilágítva végeztünk kísérleteket.

2. Az enzimhasítási vizsgálatokat Straub B-miozinos módszerével végeztük Ostwald-viszkóziméterrel. Minden esetben a különböző koncentrációjú ATP oldatokból közvetlenül a vizsgálat előtt készítettük az 50 γ /ml hígítást és rögtön a viszkoziméterbe az 1,5 ml B-miozinhoz adtuk a vizsgálandó ATP-oldat 1 ml-jét. A különböző koncentrációjú ATP oldatok enzimhasítási vizsgálata egyszerre több viszkoziméter felhasználásával történt.

3. A spektrogramok felvétele szobahőmérsékleten 50 γ /ml oldatban történt.*

A Beckman-féle spektrofotométer DU modelljét használtuk (1 cm-es kvarcküvetta 0,5 mm-es réstávolság és közepes érzékenység). A spektrogramok felvétele és az enzimhasítási vizsgálatok legtöbbször egyidőben folytak el. Többször volt, hogy ezt nem tudtuk betartani. Ilyenkor valóban észleltük, hogy az enzimhasítás-vizsgálatok eredménye és az UV spektrogramok lefutása egymástól lényegesen eltért, jeléül annak, hogy az eltelt időben az ATP molekula megváltozott.

4. A szervesetlen foszformeghatározást Fiske és Subarow módszerével végeztük (4).

5. Az ammóniát kolorimetriásan határoztuk meg (4).

Kísérleti eredmények és azok megbeszélése

Az enzim hasítási ábrákból látjuk, hogy a különböző koncentrációjú ATP oldatokban 0 C fokon fényen és sötétben különböző ideig tartó állás után az enzimhasíthatóság és az ennek megfelelő extinkciós értékek különbséget mutatnak. A vizsgálatokat 1952 őszéig folytattuk és kb. 120 kísérletsorozatot végeztünk. Legtöbb esetben azt tapasztaltuk, hogy a fényen álló nem puffertolt vizes ATP oldat a sötétben álló ugyanazon koncentrációjú ATP oldathoz képest kifejezetten hasíthatóbbá válik. Ez a hasíthatóság-fokozódás a hőmérséklet emelkedésével egy bizonyos határig megfordíthatóan fokozódik. Ha a magasabb hőmérsékletről visszavisszük 0 C fokra, enzimhasíthatósága újból leesik. Látjuk, hogy a fényen tartott különböző koncentrációjú ATP oldatokból készített 50 γ /ml ATP oldatok hasíthatósága annál lassúbb, minél nagyobb az ATP oldat koncentrációja. Ennél még lassabb a sötétben tartott ATP oldatok hasíthatósága. E nagyszámú kísérletben volt néhány, amikor ez az általános fotokémiai hatás fordított volt: részben a sötétben tartottak mutattak fokozottabb hasítást, illetve a nagyobb koncentrációjuk mutatták ugyanezt. Azonban ezekben az esetekben is fennállott a hasíthatóság és az extinkció közötti szabályszerű összefüggés: a fokozott hasíthatósághoz csökkent extinkció, a lassított hasíthatósághoz pedig fokozott extinkció tartozott. Az enzimhasíthatóság és az abszorpciós ultraviola spektrogram viselkedése

* A spektrogramokat az Analitikai Kémiai Intézetben Pungor adjunktus vette fel.

között fennálló szabályszerűséget minden esetben így tapasztaltuk. Több esetben, bizonyos koncentrációs tartományokban (1—10 mg/ml-ig) nem úgy változott az enzim hasíthatósága, hogy az a koncentráció sornak megfelelően. Azonban itt is mindig fennáll a hasíthatóság és az extinkció közötti szabályszerű összefüggés. Ez lényeges, mert ez is arra mutat, hogy a szubsztrátum enzim hasíthatóságát egy adott pillanatban a molekula fizikokémiai (konfigurációbeli, energetikai) állapota határozza meg. Hogy ezekben a különböző koncentrációjú ATP oldatokban fényen és sötétben tartva az észlelt nagy különbségeket mutató esetekben valóban a hasítási sebesség fokozódásáról, illetve lassításáról van szó — a napfény (sötét), a koncentráció, a hő és egyéb esetleg nem kontrolálható tényezők hatására — azt a lehasított szerves foszfor mennyiségének meghatározásával is bebizonyítottuk. Azt találtuk, hogy a különböző koncentrációjú oldatokból készített 50 γ /ml oldatokban egy megadott ideig tartó hasítás után ott volt a legtöbb foszfor, ahol a hasítás sebessége a legnagyobb (4). A különböző koncentrációjú ATP oldatokban nem volt a fény, illetve a többi tényezők hatására lehasadt szerves foszfor; pirofoszfát lehasadása ellen a hasítási görbék felvétele szól. Az ATP amidocsoportja sem hasadt le ammóniaképződés közben. A csatolt ábrákból láthatjuk, hogy a különböző feltételek hatására növekedett, illetve csökkent az ATP molekula enzim hasíthatósága, mely tulajdonságot az ATP molekula egy megadott fizikokémiai állapota határozza meg. Ezekben a kísérletekben a feltételek olyanok, hogy az enzim hasíthatóság-fokozódás, illetve lassítás reverzibilisen egymásba átalakulhat. Ez arra mutat, hogy az alkalmazott feltételek mellett nagyon finom molekula-változásokról lehet szó, amelyek kis energiabefektetéssel idézhetők elő. Ez biológiai és sejtökonómiai szempontból is jelentős, mert arra mutat, hogy az ATP molekulából az energiakinyerés sebessége kis energia befektetést igénylő mechanizmusokkal reverzibilisen szabályozható.

Az első ábrán és 1. táblázatban láthatjuk, hogy milyen nagy a különbség az 50 γ /ml, illetve az 50 mg/ml koncentrációban álló ATP között. A fény-sötét hatás a nagyobb koncentrációnál kifejezettebb. A nagyobb koncentrációban álló ATP hasíthatósága az idő függvényében csökkenően hullámzik. Viszont a kis koncentrációban álló ATP a már 24 órai állással elért maximális hasíthatóságot gyakorlatilag nem változtatja. Ebből a viselkedésmódból arra következtethetünk, hogy egy bizonyos egyensúlyi állapot felé való törekvés figyelhető meg az alkalmazott feltételek között. Az 1. b ábrán és 2. táblázatban ugyancsak jellegzetesen kitűnik a különböző koncentrációban való állás és a fény-sötét hatáskülönbség.

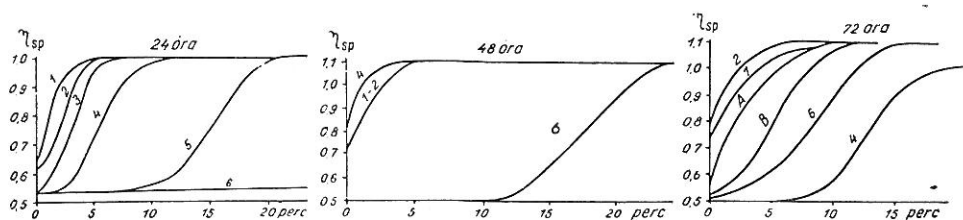
Általában azt tapasztaltuk, hogy az egészen kis koncentrációban (2—300 γ /ml) való állásnál a fény-sötét hatás kevésbé kifejezett és egy maximálisan elért hasíthatóság után a hasíthatóság időben már alig változik. A 2. ábrából kitűnik, hogy a fentemlített 1—10 mg/ml koncentrációs tartományban a hasíthatóság és ennek megfelelő UV abszorpciós optikai viselkedésmód elüt a koncentráció sortól. Ezt igazolja a 3. ábra. Láthatjuk, hogy éppen a legnagyobb koncentrációkban álló ATP válik leginkább hasíthatóvá. Azonban a hasíthatóság és az extinkció közötti szabályszerű összefüggés itt is fennáll. A 4. ábrán, mutatjuk a koncentráció, a fény-sötét effektus és a hőmérséklet hatását. Így általában kitűnik, hogy a hőmérsékletnek lényeges hatása van a fény-sötét hatás kifejtésében a különböző koncentrációs tartományban. A hőmérsékletnek ez a hatása lényeges és jellemző. Ezen enzimasítási görbékhez csatolt megfelelő UV abszorpciós spektrogramok az alábbi három jellegzetességet mutatják:

a) Minél lassúbb a hasítás, annál nagyobb az extinkció. Emellett azonban azt is észrevehetjük, hogy nemcsak az extinkció magassága változik, hanem a

1. táblázat

Fényben és sötétben 0 C°-on különböző ideig tartott különböző koncentrációjú ATP oldatok UV abszorpciók spektrum értékei

A preparálás után rögtön felvéve (1)											
$\mu\mu$	280	270	265	260	255	250	240	230	220		
Ext.	0,276	1,000	1,35	1,63	1,40	1,21	0,612	0,278	0,700	—	
24 órai állás után Ext. (2)											
1.	0,258	1,01	1,35	1,50	1,40	1,20	0,582	0,255	0,670	50 γ /ml fényen	
2.	0,262	1,00	1,34	1,50	1,40	1,20	0,592	0,268	0,678	50 γ /ml sötétben	
4.	0,339	1,26	1,69	1,95	1,79	1,50	0,748	0,338	0,882	50 mg/ml fényen	
6.	2 >	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	50 mg/ml sötétben	
48 órai állás után Ext. (2)											
$\mu\mu$	280	270	265	260	255	250	240	230	220		
1.	0,168	0,910	1,34	1,50	1,42	1,22	0,584	0,254	0,675	50 γ /ml fényben	
2.	0,175	0,990	1,34	1,50	1,42	1,23	0,596	0,268	0,536	50 γ /ml sötétben	
4.	0,223	0,892	1,23	1,33	1,28	1,00	0,599	0,243	0,603	50 mg/ml fényen	
6.	0,468	1,67	2 >	∞	∞	1,90	1,02	0,498	1,19	50 mg/ml sötétben	
A.	19 napos állás után	0,230	0,93	1,27	1,38	1,34	1,11	0,542	0,231	0,602	50 mg/ml fényen
B.		0,476	1,19	2 >	2 \gg	2 >	1,05	0,511	1,25	50 mg/ml sötétben	
72 órai állás után Ext. (2)											
$\mu\mu$	280	270	265	260	255	250	240	230	220		
1.	0,258	0,990	1,35	1,50	1,45	1,20	0,607	0,369	0,688	50 γ /ml fényben	
2.	0,252	0,970	1,34	1,49	1,43	1,19	0,595	0,258	0,667	50 γ /ml sötétben	
4.	0,426	1,55	2 >	2 \gg	2 >	1,88	0,945	0,438	1,15	50 mg/ml fényen	
6.	0,370	1,31	1,75	2	1,88	1,57	0,804	0,397	0,980	50 mg/ml sötétben	
A.	20 napos állás után	0,227	0,940	1,28	1,40	1,35	1,13	0,549	0,223	0,592	50 mg/ml fényen
B.		0,304	1,04	1,52	1,62	1,01	1,36	0,704	0,328	0,790	50 mg/ml sötétben



1 a. ábra.

Különböző koncentrációjú ATP oldatok hasíthatósági görbéi 24, 48 és 72 órás állás után 0 C°-on.
 1: 50 γ /ml fényen. 2: 50 γ /ml sötétben. 3: 50 γ /ml fényben 0 óráig. 4: 50 mg/ml fényben. 5: 50 mg/ml sötétben 11 óráig. 6: 50 mg/ml sötétben.

2. táblázat

168 óráig fényben és sötétben tartott különböző koncentrációjú APT oldatok UV abszorpciós spektrogram értékei (0 C°-on)

μ	280	270	265	260	255	250	240	230	220
1. 50 γ /ml fényen	0,308	1,13	1,50	1,64	1,59	1,33	0,671	0,295	0,80
3. 3 mg/ml fényen	0,242	0,970	1,32	1,45	1,38	1,15	0,558	0,220	0,558
5. 5 mg/ml fényen	0,403	1,40	1,88	2 >	2 >	1,75	0,855	0,396	0,977
2. 50 γ /ml sötétben	0,270	1,13	1,47	1,60	1,56	1,35	0,612	0,237	0,680
4. 3 mg/ml sötétben	0,282	1,06	1,42	1,57	1,49	1,25	0,633	0,282	0,661
6. 5 mg/ml sötétben	0,385	1,47	1,95	2 \gg	2 >	1,70	0,848	0,368	0,961

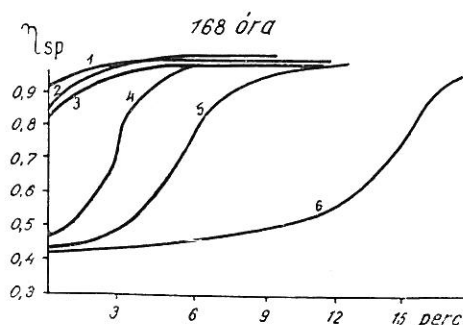
maximum szélessége is. Ez arra mutat, hogy ezekben az ATP molekulákban az elektronikus nívók és a vibrációs nívók szorosabban vannak csatolva, mint ott, ahol az abszorpciós maximum éles.

b) Az abszorpciós maximum kiszélesedése annál kifejezettebb, minél lassabb volt a hasítás, illetve minél koncentráltabb oldatból származott a vizsgálatra kerülő ATP.

c) A minimum annál jobban felemelkedik, minél koncentráltabb oldatból származott a vizsgálatra kerülő 50 γ /ml ATP oldat. Másrészt pedig észrevehetjük, hogy a rövidebb hullámok felé az abszorpció intenzitása kifejezetten növekszik. Ez a hatás is jellemző, mert arra mutat, hogy az ATP molekula úgy változott meg, hogy az UV abszorbeálódás helyén nemcsak a molekula síkjában egy meghatározott irányban történik a fény elektromos vektorának elnyelődése, hanem erre a síkra merőleges irányban is valószínűbbé válik a tranzíció.

Fejtegetésünk nem teljes értékű, mert az itt bemutatott hatás értelmezésére még nagyon sok kísérleti vizsgálat hiányzik. Azok a módszerek és eszközök, amelyekkel ezeket az eredményeket elérhettük volna, eddig nem álltak rendelkezésünkre. A továbbiakban röviden néhány elvi szempontot mutatunk rá, melyek részben megvilágítják az itt szereplő mechanizmusokat, részben pedig útmutatóul szolgálnak az észlelt hatások mechanizmusának kiderítésére.

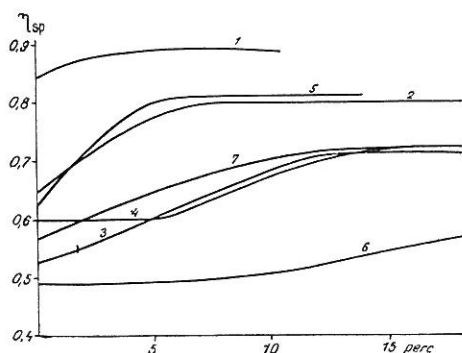
A sokatomos molekulákban jelenlévő összes töltés nem egyformán van eloszolva a molekulákban, hanem bizonyos atomcsoportokon, sőt atomokon gyűlik össze a töltés. Ennek következtében a molekulában negatív és pozitív töltéssel ellátott, nagy sűrűségű helyek keletkeznek. Ezek a nukleofil, illetve elektrofil centrumok igen fontos szerepet játszanak a kémiai reakciókban, különösen a szerves kémiai reakciókban. Ezek nemcsak molekulák közti, hanem molekulán belüli atomeltolódásokat is hozhatnak létre.



1 b. ábra.

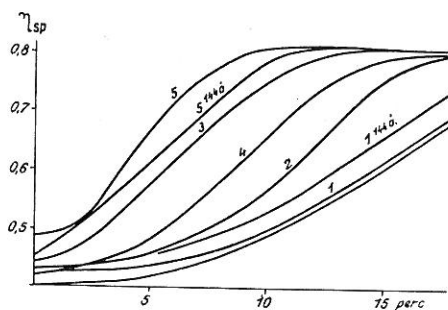
Különböző koncentrációjú ATP oldatok hasításhatósági görbéi 168 órai állás után 0 C°-on. 1: 50 γ /ml fényen. 2: 50 γ /ml sötétben. 3: 3 mg/ml fényen. 4: 3 mg/ml sötétben. 5: 5 mg/ml fényen. 6: 5 mg/ml sötétben.

Arról még keveset tudunk, hogy az ATP-ben milyen a töltéseloszlás. De nagy valószínűséggel felvehetjük, hogy az adeninvázban már alapállapotban is van töltésseltolódás. Ma már sokat tudunk a szubsztituensek által okozott



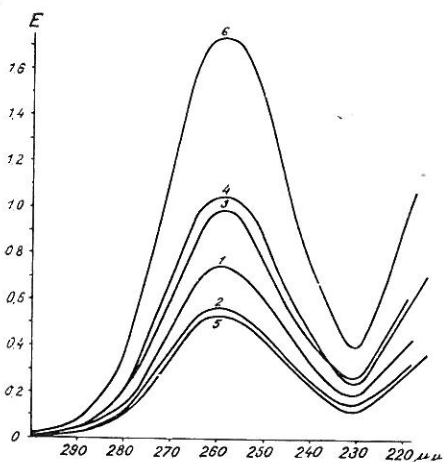
2 a. ábra

Különböző koncentrációjú ATP-k hasíthatósági görbéi, 0 C°-on fényben. 1: 50 γ/ml 2: 500 γ/ml 3: 2,500 γ/ml 4: 5,000 γ/ml 5: 10,000 γ/ml 6: 100,000 γ/ml 7: 1,000 γ/ml.



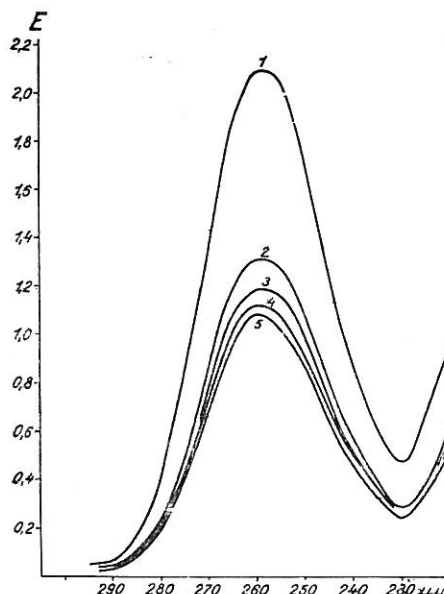
3 a. ábra

Különböző koncentrációjú ATP 48 órai állás után 0 C°-on fényben. 1: 50 γ/ml 2: 250 γ/ml 3: 5,000 γ/ml 4: 1,000 γ/ml 5: 10,000 γ/ml.



2 b. ábra

Különböző koncentrációjú ATP-k spektrogramja 0 C°-on fényben. Jelzéseket lásd 2 a. ábra.

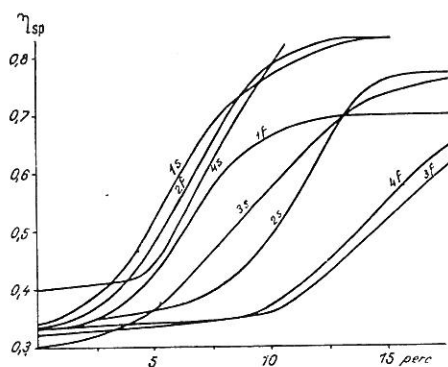


3 b. ábra

Különböző koncentrációjú ATP spektrogramja 48 órai állás után 0 C°-on fényben. Jelzéseket lásd 3 a. ábra.

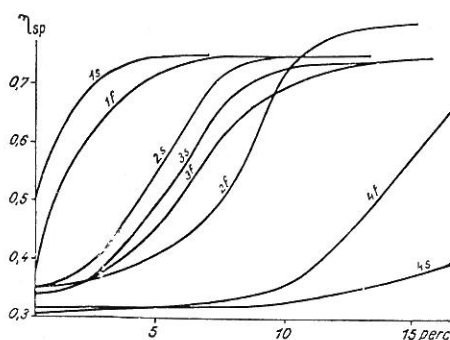
töltésseltolódásokról. Így az ATP-ben az aminogycsoport működik, melynek következtében a pirimidin molekulában C₁ atomhoz képest o — p helyzetbe tolódik a negatív töltés és itt különösen a két magnitrogénben halmozódik fel az elektronfelhő, melyet még fokoz a nitrogénmagok elektronszívó

hatása is. Tehát ezáltal egy Y tengely (trans) irány polarizálódás lép fel. Broohead legutóbbi, adeninhidrokloridon végzett krisztallográfiai vizsgálataiból tudjuk, hogy a központi C_4-C_5 kötéstávolság 1.44 Angström. Ez az érték szignifikánsan nagyobb, mint a többi $C-C$, illetve $C-N$ kötés a molekulában. Taylor kimutatta, hogy itt a $pK' = 4, 15$, $pK' = 9,8$. Az előbbi ionizációs konstans az aminocsoportnak, az utóbbi pedig az imidazol gyűrűben az NH csoport ionizációs konstansának felel meg. Azonban ez az érték lényegesen kisebb, mint más purin-származékokban észlelt disszociációs állandó. Az adeninben ezen csoport ilyen szokatlan aciditását csak úgy tudjuk megmagyarázni, ha a neutrális adenin molekulák mellett még bizonyos töltéshelyezkedéssel bíró struktúrákat is felveszünk. Így az imidazol gyűrűben az NH-nál pozitív és a pirimidin gyűrűben az egyik vagy a másik magnitrogénen negatív töltés halmozódhat fel. Tehát ezáltal egy X (long) irányú töltésszeparálódás lép fel. Ezek alapján valószínűleg felvehetjük, és különösen pedig az energetizált ATP molekulában, hogy legalább is az adeninvázban dipol vagy kvadrupol keletkezik.



4 a. ábra

Különböző koncentrációjú ATP oldatok
enzimatis hasíthatósága 0 C°-on



4 b. ábra

Különböző koncentrációjú ATP oldatok
enzimatis hasíthatósága 40 C°-on

72 órai állás után fényben-sötétben (egyidőben mérve.) f = fényben. s = sötétben. 1: 50 γ/ml. 2: 1 mg/ml. 3: 10 mg/ml. 4: 100 mg/ml.

Véleményünk szerint az ATP molekulák az alkalmazott feltételek következtében az alábbi mechanizmusok alapján csökkenthetik, illetve növelhetik energiataartalmukat, minek következtében enzimes hasíthatóságuk is csökkenhet, illetve fokozódhat.

1. Tudjuk, hogy a különböző rendszerekben (5, 21) az atomokra, molekulákra különböző erők hatnak. Az atomok közti erők a Coulomb-erőkből és a kicserélődési erőkből tevődnek össze. A molekulák között az ú. n. van der Waals-erők működnek. A semleges atomokat, illetve molekulákat egyszerűen úgy lehet sematizálni, hogy egy pozitív töltött centrumból állanak, amelyet a negatív töltés felhőszerte körülvész. Ha a pozitív töltésű centrum elmozdul egyensúlyi helyzetéből, akkor egy bizonyos frekvenciával rezegni fog. A kvantumelmélet szerint egy ilyen oszcillátor a lehetséges legalacsonyabb energiaállapotában is $\frac{1}{2} h\nu_0$ energiával bír. Így az atom, illetve a molekula ezen egyedüli okból kifolyólag is mindig mutatja a dipolmomentum fluktuációját. Ennek átlagos értéke 0, de a legtöbb pillanatban véges értékkel rendelkezik. Ezzel kapcsolatban a legjelentősebb tény az, hogy a

dipolusnak ez a fluktuálása más molekulában hasonló dipolusokat indukál. Az indukáló, illetve indukált dipolusok közötti ezen egymáshatások következtében a molekula energiája csökkenni fog. A van der Waals vonzóerőknek ez az eredete. Így ezek a molekulák közötti, illetve molekulán belüli erők a dipolhatásból, az indukációs hatásból és a London-féle diszperziós erők hatásából tevődik össze. (Diszperziós elnevezése onnan származik, hogy ezekben a számításokban alkalmazott oszcillátorikus frekvenciák azok, mint amelyeket a fény diszperziós elméletében is számításba vesznek.) Szinte azt lehet mondani, hogy a van der Waals vonzási erőkben ezek a London-féle diszperziós erők szerepelnek legnagyobbbrészt, a legtöbb fajta molekulánál is.

2. A momentummal rendelkező molekulák két jelentős hatást gyakorolnak - Az egyik, hogy egy másik molekulában dipolust indukálnak úgy, hogy az indukált momentum iránya olyan, hogy vonzást eredményez; másrészt pedig a dipolus molekulákon meghatározott irányítást okoz. Mindkét hatás eredménye a potenciális energia csökkentése. Ezen háromféle kölcsönhatás mennyiségileg jelentősen változik a különböző fajta molekuláknál. Pl. szénmonoxidnál a London-féle diszperziós erők hatására áll elő a kölcsönhatás más molekulával, míg víznél, amely nagy permanens momentummal rendelkezik, a teljes hatás kb. 4/5-ét az orientációs erők adják. Ez a későbbiekben, mint látni fogjuk, nagy jelentőségű. Mármint a van der Waals erőkből eredő vonzás végeredményben dipol természetű, akár a zéro-pont oszcillációkból, akár a permanens momentum orientációjából, akár az indukációs hatásból ered is. A kölcsönhatás potenciális energiája az egymást vonzó részecskék közötti távolság hatodik hatványával fordítva arányos: $1/r^6$. A kölcsönhatásból származó potenciális energia-csökkenés:

$$\frac{h\nu_j e^4}{2k^2 r^6} = \frac{h\nu_0 \alpha^2}{2r^6}$$

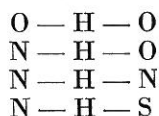
Itt az *alfa* a polározhatóságot, az *r* a dipolusok közötti távolságot, *k* a visszahúzó erőt jelenti.

3. Említettük, hogy a dipolmolekulák egymás között nemcsak extra momentumokat indukálnak, hanem olyan orientációt is okoznak, amelyek a potenciális energiát csökkentik. Az orientáció alacsony hőmérsékleten csaknem teljes. Azonban ez a hőmérséklet emelkedésével nagyon gyorsan változik, mert a hőmozgás az így beállott rendezettséget mindinkább széttroncsolja. Ilyen állapotban a két dipolus kölcsönhatásának energiája nemcsak az erőtérrel változik, hanem az orientáció miatt is. És ekkor $1/kT$ határozza meg a hőmozgás ellenében az orientáció ellenállását. Az orientációs energia pedig kifejezetten a hőmérséklettől függ. Valószínű ez az oka, hogy kísérleteinkben a hőmérséklet emelkedésével a kis koncentrációban álló ATP hasíthatósága gyorsan emelkedik és hogy itt a fény-sötét hatás nem kifejezett. Ezzel ellentétben a nagy koncentrációban álló ATP oldatoknál a fény-sötét hatás igen kifejezett.

4. Amikor a molekulákat nagyon nagy közelségbe hozzuk egymáshoz (nagy koncentráció) a vonzás taszításba csap át, mert az elektronfelhők kezdik átfedni egymást. Itt a taszítási erő nagyságát rendkívüli mértékben befolyásolja az egymáshoz közeledő dipolusok molekulaszervezete. Megfelelő szerkezet lehetővé teszi a legnagyobb mértékű megközelítést a taszítási energia kisebb értékű maximumával. Ez úgy jön létre, hogy az egymáshoz közeledő molekularészecskék bizonyos átrendeződés következik be. A megközelítésnek egy ilyen módja vezet leggyorsabban a továbbiakban reakcióhoz. A dipolmomentummal rendelkező molekulák között

(illetve kvadrupolmolekulák között) különböző fokú asszociációk léphetnek fel. Így az előbb leírt van der Waals-féle erők különböző mértékű hatására különböző molekulák közötti kölcsönhatások keletkeznek, aminek következménye a különböző potenciális energiák kialakulása, a dipolmomentum csökkenése. Továbbá a dipolmolekulákban a magtávolságok növekszenek és ezáltal megváltozik a dipolban szereplő atomok frekvenciája és magának a dipolmomentumnak a rezgés alatti változása is. Ennek következménye a kötés gyengülése, különösen ha a hőmérséklet emelkedik, mert ezáltal a csatolás kisebb lesz. Különösen kifejezett ez a kettős kötést tartalmazó dipolusoknál, mert a kettős kötés π elektronsűrűsége is erős vonzást gyakorol a környezet protonjára. Ezáltal különböző mértékű asszociációk állanak elő. A molekulák közötti kölcsönhatás kialakulásában rendkívül fontos szerepe van annak, hogy az állandó momentummal rendelkező molekulák milyen oldószerben vannak. Ugyanis az oldószer molekulák orientációja az oldott molekulák síkjához képest nagymértékben befolyásolja az interakciós energia nagyságát.

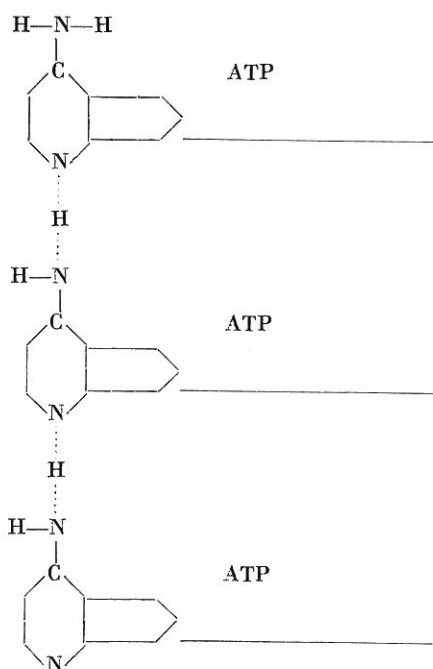
Beckmann, Auwer, Paterno és többen már régebben kimutatták, hogy bizonyos atomcsoportokat tartalmazó vegyületek között molekuláris asszociációk lépnek fel. Ezt az asszociációt különösen az alábbi atomcsoportok teszik lehetővé: hidroxil, karboxil, oximino és amido. Az ezen csoportokon keresztül létrejött asszociációt a hidrogénatom hozza létre. Két fontos tényező szükséges ahhoz, hogy két különböző molekula a hidrogén kötésen keresztül asszociálódhasson: 1. Hogy egy elektron donor atom legyen jelen (O, N, illetve néhányszor S) és 2. hogy egy elektron akceptor legyen jelen, mely legtöbbször hidrogénatom. Az asszociáció fokát nagymértékben befolyásolja az oldószer természete. Ez lehet szintén maga is asszociatív, illetve deasszociatív. Az az oldószer, amelyben van olyan csoport, mint az asszociációs csoportokban, az az asszociáció ellen hat. A hidrogénkötés leginkább azokban a vegyületekben fordul elő, amelyekben az alábbi atomcsoportosulás lehetséges.



Az ilyen vegyületek tautomer viselkedést mutatnak. Ebből azt következtetik (7, 6, 12, 14, 13, 1, 3), hogy a molekula asszociációja és a tautomer viselkedésmód közösen arra vezethető vissza, hogy a hidrogén tulajdonképpen hol az egyik, hol a másik molekulához tartozik. Ezáltal a hidrogénnek mintegy vibrációs állapota fejlődik ki. Ez az oka annak, hogy mindmáig sem sikerült egyik vagy másik reális tautomer formát kémiaiilag identifikálni. A tautomer vegyületek általános szerkezete szerint a különböző molekulák között egy tautomer lánc alakul ki, mely az alábbi képlet szerint egymással egyensúlyban áll: $\text{H} \cdot \text{A} \cdot \cdot \cdot \text{B} \rightleftharpoons \text{A} \cdot \cdot \cdot \text{B} \cdot \text{H}$. Ebben a tautomer egyensúlyban a hidrogénnek (illetve a protonnak) A—B-ig való eltolódását az $\text{A} \cdot \cdot \cdot \text{B}$ láncban lévő vegyértékek újrendeződése kíséri. Ilyen tautomer formák nemcsak molekulák között, hanem molekulán belül is képződhetnek. Beláthatjuk, hogy ennek kialakulását sztérikus gátlást okozó nagy volumenű szubsztituensek gátolhatják. A molekulán belüli tautomeria azonban csak akkor alakulhat ki, ha a hidrogénkötést létesítő csoportok koplanárisak.

Véleményünk szerint kísérleteinkben használt rendszerekben az ATP molekulák a különböző koncentrációs tartományokban az alábbi módon asszociálódhatnak.

Az 5. ábrán láthatjuk, hogy $N-H-N$ tautomer asszociáció keletkezett. A nitrogénatomokat összekötő tengely körül az egész ATP molekula még elég szabadon foroghat és ezáltal egymáshoz viszonyítva különböző irányítotttságot vehet fel. Ez, mint az előbb láttuk, komoly mértékben befolyásolja az interakciós energia nagyságát és ezáltal a molekula energiaállapotát. Ez az energiaállapot így az orientációtól függően különösen a hőmérséklet változásra érzékeny. A 6. és 7. ábrán $N-H-O$ tautomer asszociáció megvalósulását látjuk. Az ábrából kitűnik, hogy itt már az egyes ATP molekulák egymáshoz képest kevésbé mozdulhatnak el a többszörös asszociáció miatt. Ez már nagyfokú sztérikus gátlást jelent. Tulajdonképpen így egy valóságos térhálózat alakul ki. Ebben az asszociációs formában az ATP reakciós centrumainál: a pirofoszfát láncnál már nagyfokú sztérikus gátlás van. Ennek az enzimes hasíthatóságban az a következménye, hogy a pirofoszfát lánc helyes orientációjának kialakulása az enzim felületen nagymértékben akadályozott. Hunter (7) és Barker nagyon szépen mutatták be ezt az asszociációt, illetve az imino-csoportban a hidrogénnek szubsztituenssel való sztérikus gátlásával az asszociáció megszűnését. A 8. ábránkon $O-H-O$ asszociációt mutatjuk be. A pirofoszfát lánc kettős kötésű oxigénje asszociál a hidrogén kötésen keresztül a pirofoszfát lánc szembenlévő OH csoportjával. Természetesen mind a három hidrogénkötés kialakulása nem valószínű. Ennél az asszociációs formánál is beláthatjuk, hogy a pirofoszfát lánc rotációja az enzimfelületen nagymértékben akadályozott a helyes orientáció kialakulása érdekében.



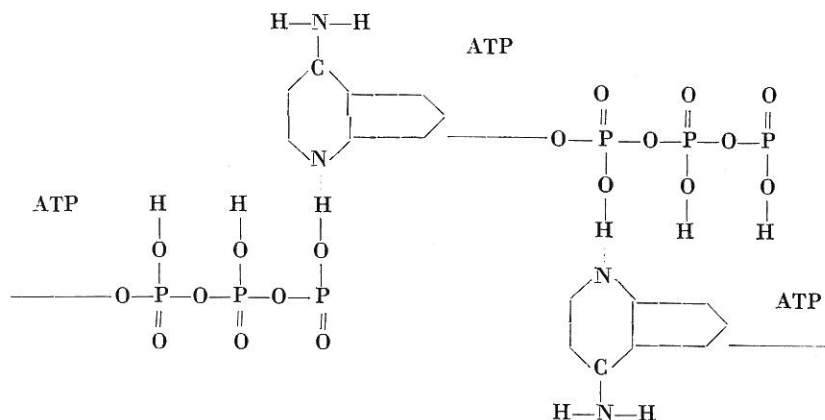
5. ábra

Másrészt pedig az is lehetséges, hogy az asszociáció a hidrogénhíd kötésen keresztül nemcsak egy síkban képződhet, hanem az egyik ATP molekula a másik síkjához képest különböző szög alatt áll be, mely nagymértékben befolyásolja az orientációs energia nagyságát.) Azonban az is elképzelhető, hogy az ATP molekulák nem egymás mellé, hanem egymás fölé elhelyezkedve képeznek asszociációt. Ezekből beláthatjuk, hogy miért válik az ATP molekula mindinkább nehezebben hasíthatóvá akkor, ha a mi rendszerünkben az itteni feltételek között tartva kerül hasításra. Kitűnik, hogy ez az enzimes hasíthatóság azért vált mindinkább gátolttá, mert a mindinkább nagyobb koncentrációban az egymásra asszociálódó ATP molekulákban az aktiválás entropiája mindinkább növekedett. Az ilyen mindinkább lassan hasíthatóvá vált ATP oldatok UV abszorpciós spektrogramjában az extinkció állandóan emelkedett. Ez megfelel a hasíthatóságnak és az abszorpciós extinkciójának változása közötti eddig észlelt szabályszerű összefüggésnek.

Milyen fizikokémiai alapja van annak a ténynek, hogy a mind koncentráltabb ATP oldatból származó ugyanolyan mennyiségű ATP molekula UV abszorpciós

spektrogramjában az extinkció nagymértékben emelkedik, a hasíthatóság ennek megfelelően csökken? Véleményünk szerint abban, hogy a különböző koncentrációs tartományokban lévő ATP molekula extinkciója állandóan emelkedik, az alábbi tényezők szerepelnek.

a) Kimutattuk, hogy a pirofoszfát lánc az ATP molekula UV abszorpciós spektrogramjának kialakításában jelentős szerepet visz: a pirofoszfát lánc eltávolításával az extinkció nagymértékben csökken (4). Tehát, ha az ATP molekula egész kromoforjának ezen részét *azáltal nagyobbítjuk*, hogy egymásba kapcsoljuk e kromoforokat, akkor az extinkciónak növekednie kell. Ez a felfogásunk össz-

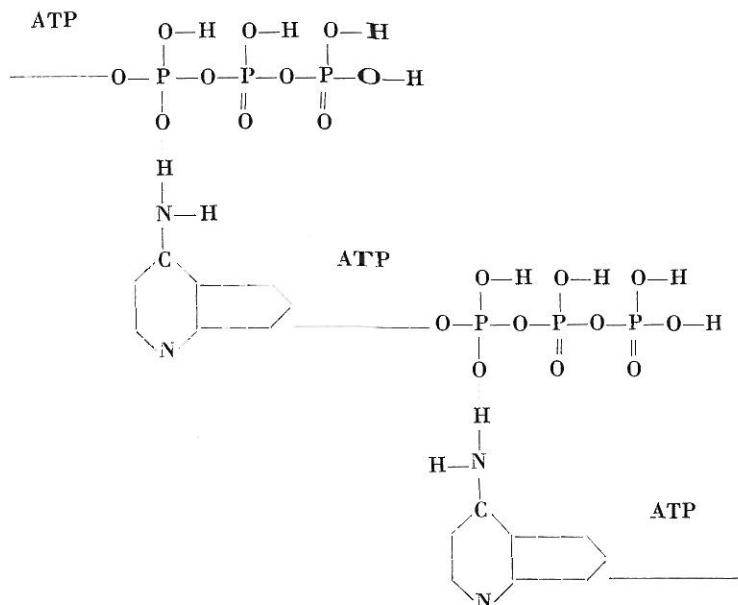


6. ábra

hangban van Pauling peptidek közötti hidrogénhid kötésre kialakított elméletével. Ő itt a) N—H—N és b) O—H—N hidrogén hid-kötéssel megvalósított asszociációt vesz fel. Szerinte a) ritkábban fordul elő és a b) asszociáció valószínűbb. A b) forma egy rezonanciasisztémát képez, amelyben nem a proton, hanem csak a kettős kötés helye változik meg. Ez az állapotváltozás rezonanciánál 21 kcal energiaváltozással van összekötve. A hídképződés a mezomer rezonanciastruktúrák között jön létre. Így b) formulában a nitrogénre kötött hidrogénatomok koplanáris konfigurációt adnak, mivel Pauling (12) szerint a nitrogén kötésszöge tetraedrikusan irányul. A hidrogén atomoknak ez a koplanáris konfigurációja pedig egy trans-cis izoméria lehetőségére enged következtetni. Pauling felhívta a figyelmet, hogy a fehérjék denaturálásánál éppen ezek a hidrogénhid kötések szakadnak fel, illetve tolódnak el, miáltal a cis-trans izoméria egy meghatározott irányban tolódik el. Szerinte a hidrogénhid kötés a molekula UV fényabszorpciójában lényeges szerepet visz. A hidrogénhid kötés éppen egy széles sávban jelentkezik az abszorpciós görbében. Az extinkciós sávok magassága az illető kromofor csoportnak az egyik módosulatából (*cis-trans*), a másik módosulatba való átmeneti valószínűségétől függ, illetve a kromofor koncentrációjának a függvénye. Ez teljesen összhangban van a mi felfogásunkkal.

b) Longuet—Higgins, Coulson (8) és Pullmann (16) kvantumkémiailag számították ki, hogy bizonyos gyűrűs szerves vegyületekben, valamint nitrogéntartalmú heterogyűrűs vegyületekben a molekula töltésének egy bizonyos irányba való eltolódása, polarizálódása, már alapállapotban is növeli

az extinkció értékét. Valóban Mulliken (10), Nakamoto (11), Powell (12, 13, 14, 15), Michaelis (9) és Kiss kísérleteikkel ezt bizonyították is. Azt is kimutatták, hogy a molekula gerjesztett állapotában a polarizáció irányában még inkább kifejezettebbé válik a töltések szétválása és ennek megfelelően az extinkció nagymértékű megnövekedése észlelhető. Az ATP-nél valószínűen

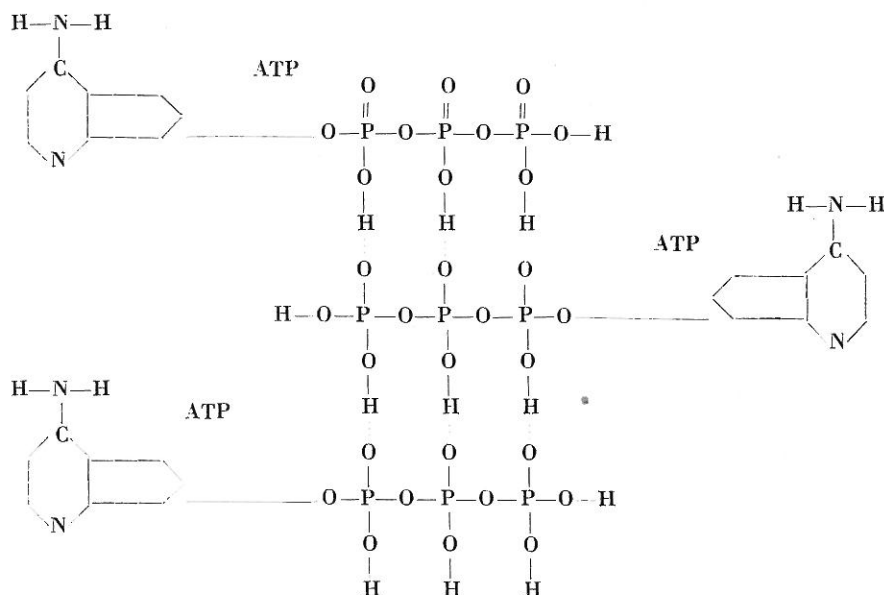


7. ábra

az történik különösen az 5., 6. és 7. ábrában kifejezett asszociációs formáknál, hogy a purinváz *Y* (*transz*) irányú töltésseltolódása fokozódik. Ez a töltésseltolódás már monomér állapotban valószínűen megvolt a C/1 atomon lévő NH_2 szubsztituens o-p irányú elektrontaszító hatásánál fogva. Ezt az asszociációt lehetővé tevő hidrogén még csak fokozza. Ez méginkább fokozódik a második és harmadik ábrán látható asszociációs formáknál az oxigén igen nagyfokú elektronszívó hatása miatt.

c) Mulliken (10) elmélete szerint, ha bármely ok miatt a benzolgyűrű, illetve ehhez hasonló gyűrűk (mit pl. piridin, pirimidin) π elektron felhője annyira megközelítik egymást, hogy a π elektronok között vonzódás léphet fel és ennek következtében a π elektron felhő egymásba ér: akkor a molekula a beeső fénynek a gyűrű síkjára merőleges vektorát is elnyeli. Ez azt jelenti, hogy a fényelnyelődést megvalósító elektronmozgás nemcsak a gyűrű síkjában, hanem a gyűrűre merőleges irányban is keresztülvihető lesz. Az elnyelődés mértékét eszerint az szabja meg, hogy milyen fokú ennek a π elektron felhőnek a gyűrű síkjára merőleges irányban való eltolódása. A purinváznál, mint amilyen az adenin, illetve ennek származékai, általában a fényelnyelődés magyarázatául azt veszik fel, hogy a váz síkjában egy tengely van, amelyben a fény vele párhuzamosan rezgő elektromos vektora elnyelődik. A váz síkjára merőleges irányban való elnyelődés valószínűsége csak a rövidebb hullámoknál kezd megvalósulni. Tehát, ha a Mulliken - elmélet értelmében az ilyen adeninváz más adeninvázakkal párhuzamosan helyezkedik el

és dipol-kvadrupol erők hatása alatt nagy közelségbe jutnak egymáshoz, úgy hogy a π elektron felhők egymásba érjenek, akkor nemcsak a gyűrű síkjában, hanem arra merőleges irányban is nyelődik el fény. Ezt valóban látjuk a nagy koncentrációjú ATP molekuláknál is. Az ilyen ATP oldatok UV abszorpciós spektrogramjának a rövidebb hullámok felé eső részének viselkedésmódját ez alapon magyarázzuk.



8. ábra

Kísérleti eredményeinket alátámasztja S i n s h e i m e r (19) és munkatársai uracil, adenin, guanin, citozin, stb. vegyületeken végzett vizsgálatai. Azt vizsgálták, hogy ezen vegyületek vizes oldatából készített hártványoknak, igen alacsony hőfokon állva levegőn, fényen, illetve vákuumban, hogyan változik a molekula UV abszorpciós spektrogramja. Levegőn, fényen való állás után már napokon belül az abszorpciós maximum helyének változtatása nélkül kifejezett extinkciócsökkenést tapasztaltak. Vákuumban ezt a hatást nem észlelték. Infravörös spektrogramban ez az UV abszorpciós változás szintén jelentkezett. Szerzők ezt a hatást az uracil, adenin, stb. molekulák bizonyos típusú aggregációjával magyarázzák, melyet a vízmolekulák irányító hatása hoz létre. Továbbá azt gondolják, hogy ugyancsak a víz közbejöttével bizonyos tautomer formák, illetve ezek egyensúlyi állapota fejlődik ki. Szerzők thiminnél, citozinnál, izocitozinnál, és fenilalaninnál nem tudták ezt a hatást kimutatni.

Commoner (2), Scheibe (18), Sheppard (20), Larionov és Brunberg, valamint Ris és Mirsky (17) kimutatták, hogy a különböző nukleinsavak abszorpciós spektrogramjainak intenzitása lényegesen változik azokkal a fizikokémiai feltételekkel, amelyek a nukleinsavak különböző aggregációját, illetve bizonyos polimerizációját előidézik.

Az itt röviden vázolt kísérleti eredményeinkkel kapcsolatban véleményünk az alábbi.

Az ATP hasíthatósága a koncentráció növekedésével általában azért vált mindinkább nehezebbé, mert az aktiválás entropiája növekedett. Az aktiválás entropiának ezt a növekedését a van der Waals-erők hatása és különböző mértékben létrejött ATP tautomer asszociációs formák hozták létre. Ezáltal az ATP aktív centrumai, a magasenergiájú foszfáteszter kötések az enzim számára nehezen hozzáférhetőkké váltak.

Az észlelt szabályszerű extinkció növekedés kialakulását azzal magyarázzuk, hogy az adeninben a transzirányú töltésszeparálódás növekedése folytán növekszik a maximum extinkciója. A rövidebb hullámok felé való extinkció növekedést, valamint a 230 milimikronnál rövidebb hullámok felé az igen erőssé váló abszorpciót a Mulliken elmélettel magyarázzuk.

Eddigi nagyszámu vizsgálatainkból általában észrevehetjük, hogy az ATP vizes oldatban a különböző környezeti behatásokra érzékenyen, már igen kis energiahatásokra változtatja szerkezetét, konfigurációját. Ezt láthatjuk pl. azoknál a molekuláknál, ahol rotációs izomerek már csekély energiabefektetéssel (2—3 kgkal) előállhatnak. Láttuk, hogy az ATP szintén már igen kis energiabefektetéssel kifejezetten megváltoztatta enzimés hasíthatóságát. Szinte azt mondhatjuk, hogy alig lehet az ATP vizes oldatát olyan körülmények között tartani, hogy rövid időn belül ne változna az enzimés hasíthatóság és ezzel összefüggő egyéb tulajdonságok. Eddigi kísérletek alapján határozottan állíthatjuk, hogy az ATP kvantitatív meghatározására sem a Straub-féle B-miozinos viszkoziméteres, sem a spektrofotométeres eljárási mód és az ez alapon működő Casperson-féle UV spektrofotométeres mikroszkópos kvantitatív módszer nem alkalmas. Ezek csak akkor lennének alkalmasak erre a célra, ha olyan standardizált módszert lehetne alkalmazni, amelyek az ATP molekulát éppen az alkalmazott feltételek zavaró behatásától megóvnák.

Köszönetet mondunk a Magyar Tudományos Akadémiának azért a hathatós anyagi támogatásért, mellyel kutatásainkat lehetővé tette. Köszönetet mondunk továbbá Schulek akadémikusnak a Beckmann-féle spektrofotométer, valamint Straub akadémikusnak a B-miozin rendelkezésre bocsátásáért.

Összefoglalás

1. Azt találtuk, hogy a különböző koncentrációban fényen-sötétben és különböző hőmérsékleten, különböző ideig álló ATP ugyanazon mennyiségei lényeges különbséget mutatnak mind az enzimés hasíthatóságban, mint az UV abszorpciós spektrogramjuk tekintetében.

2. Az enzimés hasíthatóság változása és az UV abszorpciós spektrogramban az extinkció változása között itt is fennáll a már előbb felállított szabályszerűség: fokozott enzimés hasíthatósághoz csökkent extinkció, gátolt hasíthatósághoz megnövekedett extinkció járul.

3. A fentemlített feltételek hatására, a koncentráció fokozásával állandóan gátolttá váló enzimés hasíthatóság kialakulását az aktiválás entropiájának nagymértékben való megnövekedésével magyarázzuk.

Érkezett: 1953. január 12.

Irodalom

1. Chaplin, H. O. & Hunter, L.: J. Chem. Soc. 375. 1034. 1938.
2. Commoner, B. & Lipkin, D.: Science **110**, 41. 1949.
3. Coulson, C. A. & Jacobs, J.: J. Chem. Soc. 1983. 1949.
4. Garay, K. & Guba, F.: Agrokémia és Talajtan **1** 1. 1951.

- 4 a. Garay, K. & G. Fehér, I.: *Agrokémia és Talajtan* 2, 234. 1953.
5. Hinshelwood, C. N.: *The Structure of Physical Chemistry*, Oxford 1951.
6. Hopkins, L.: *J. Chem. Soc.* 806. 1945.
7. Hunter, L.: *J. Chem. Soc.* 806. 1945.
8. Longuet-Higgins & Coulson, C. A.: *J. Chem. Soc.* 971. 1949.
9. Michaelis, L. & Granick, S.: *J. Amer. Chem. Soc.* 66, 1023. 1944.
10. Mulliken, S.: *J. Amer. Chem. Soc.* 72, 665. 1950.
11. Nakamoto, K.: *J. Amer. Chem. Soc.* 74, 390., 392., et. 1739. 1952.
12. Paulin, D. E. & Powell, H. M.: *J. Chem. Soc.* 209. 1947.
- 12 a. Pauling, L.: *J. Amer. Chem. Soc.* 61, 1860. 1939.
13. Powell, H. M. & Riesz, P.: *Nature* 161. 52. 1948.
14. Powell, H. M. et al.: *Nature* 144, 77. 1939.
15. Powell, H. M. et al.: *J. Chem. Soc.* 153 et 435. 1943.
16. Pullman, A.: *C. R. Acad. Sci. Paris.* 226, 486. 1948.
17. Ris, H. & Mirsky, A. E.: *J. Gen. Physiol.* 32, 489. 1949.
18. Scheibe, G.: *Kolloid Z.* 82, 2. 1938.
19. Sinsheimer, R., Scott, J. F. & Loofbourow, J. R.: *Nature.* 164, 796. 1949.
20. Sheppard, S. E.: *Rev. Mod. Phys.* 14, 302. 1949.
21. Walsh, E.: *J. Chem. Soc.* 331. 1948.

ОБРАТИМОЕ ПРЕВРАЩЕНИЕ АТФ-А В ВОДНОМ РАСТВОРЕ ПОД ДЕЙСТВИЕМ СОЛНЕЧНОГО СВЕТА

К. Гараи и И. Ферер.

Отдел Биохимии Агрохимического Научно — Исследовательского Института,
Будапешт.

Выводы

Растворы АТФ-а разной концентрации выдерживали в ледяной воде на солнечном и искусственном свете и в темноте и определили степень ферментативного расщепления при помощи вискозиметра Оствалда, количество неограниченного фосфора и аммиака, и кроме того сняли УФ спектрограммы.

Установили существенную разницу в ферментативной расщепляемости и в спектрограммах. Увеличенной ферментативной расщепляемости соответствовали уменьшенная экстинкция, а торможеной расщепляемости — увеличенная экстинкция.

По мнению авторов расщепляемость АТФ-а с увеличением концентрации вообще становилась все более трудной, потому что увеличивалась энтропия активации. Это увеличение энтропии активации создают ассоциальные формы АТФ-а, образовавшиеся различным образом и в различной мере. Таким образом фосфатно-эфирные связи, богатые энергией, т. е. активные центры АТФ-а становятся для ферментативного воздействия очень трудно достигаемыми.

Увеличение экстинкции объясняют таким образом, что в аденине с увеличением концентрации увеличивается и экстинкция абсорбционного максимума вследствие увеличения отделения зарядов в направлении транс. Увеличение экстинкции, наблюдаемое при более коротких волнах и очень интенсивную абсорпцию в более коротких, чем 230 мμ волн объясняют теорией Мулликена.

Рис. 1а. Кривые расщепления растворов АТФ-а разной концентрации после 24, 48 и 72 ч. наст. 1: 50 γ/мл на свете. 2: 50 γ/мл в темноте. 50 γ/мл на свете 0 ч. 4: 50 мг/мл на свете. 5: 50 мг/мл в темноте 11 ч. 6: 50 мг/мл в темноте.

Рис. 1б. Кривые расщепления растворов АТФ-а разной концентрации после 168 ч. настаивания. 1: 50 γ/мл на свете. 2: 50 γ/мл в темноте. 3: мг/мл на свете. 4: 3 мг/мл в темноте. 5: 5 мг/мл на свете. 6: 5 мг/мл в темноте.

Рис. 2а. Кривые расщепляемости АТФ-а разной концентрации при 0° С на свете. 1: 50 γ/мл. 2: 500 γ/мл. 3: 2500 γ/мл. 4: 5000 γ/мл. 5: 10.000 γ/мл. 6: 100.000 γ/мл. 7: 1000 мг/мл.

Рис. 2б. Спектрограммы растворов АТФ-а разной концентрации при 0° С на свете. Обозначения см. в рис. 2а.

Рис. 3а. АТФ-а разной концентрации после 48 ч. настаивания при 0° С на свете 1: 50 γ/мл 2: 250 γ/мл 3: 5000 γ/мл. 4: 1000 γ/мл. 5: 10.000 γ/мл.

Рис. 3б. Спектрограмма АТФ-а разной концентрации после 48 часов настаивания при 0° С на свете. Обозначения см. в рис. 3а.

Р и с. 4а. Ферментативная расщепляемость растворов АТФ-а разной концентрации (одновременное измерение) при 0° С после 72 часов настаивания на свете — темноте. f = на свете, s = в темноте. 1: 50 γ/мл. 2: 1 мг/мл. 3: 10 мг/мл. 4: 100 мг/мл.

Р и с. 4б. Ферментативная расщепляемость растворов АТФ-а разной концентрации (одновременное измерение) при 40° С после 72 часов настаивания на свете — темноте. Обозначение см. в обозначениях рис. 4а.

Т а б л и ц а 1. УФ спектрограммы растворов АТФ-а разной концентрации в содержанных в течение различного времени на свете и в темноте при 0° С.

(1) Снято сразу после обработки. (2) Экстинкция после 24, 48 и 72 ч. наст. Цифры первой вертикальной графы показывают соответствующие кривые рисунка 1а.

Т а б л и ц а 2. УБ — абс. спектрограммы растворов АТФ-а разной концентрации в содержанных 168 ч. на свете и в темноте при 0° С. Цифры первой вертикальной графы показывают соответствующие кривые рис. 1б.

Reversible Changes of Adenosine Triphosphate in Aqueous Solution Under the Effect of Sunlight

K. GARAY and I. G. FEHÉR

Section for Biochemistry, Agrochemical Research Institut, Budapest

Summary

ATP solutions of varying concentration were kept in sunlight and electric light and in darkness. The degree of enzymatic splitting has been determined by Ostwald-viscometer, further the spectrograms and the quantity of inorganic phosphorus and ammonia also established. Significant differences were observed in enzymatic splittability and in spectrograms. Increased enzymatic splittability was also connected with a reduction in extinction values, whereas inhibited splitting led to increased extinction values.

In the opinion of the authors the splitting of ATP is hindered with increasing concentrations because the entropy of activation increases. This increase in the activation entropy is due to various association forms of ATP produced in various manner and to varying degrees. Thus the active centres of ATP the phosphate ester bonds become difficultly accessible for the enzyme.

The extinction increases are explained by the fact that in the adenine the extinction of the absorption maximum increases with increasing concentrations, owing to the increase of the separation of electric charges in a *trans* direction. The increase of extinction values observed in the short wave range and the increased absorption in the wave range shorter than 230 millimicron is explained by the Mulliken theory.

Fig. 1. a. Splitting curves of ATP solutions of diverse concentration, after standing for 24, 48 and 72 hours at 0° C. 1: 50 γ/ml in light. 2: 50 γ/ml in darkness. 3: 50 γ/ml in light for 0 hours. 4: 50 mg/ml in light. 5: 50 mg/ml in darkness for 11 hours. 6: 50 mg/ml in darkness.

Fig. 1. b. Splitting curves of ATP solutions of diverse concentration after standing for 168 hours at 0° C. 1: 50 γ/ml in light. 2: 50 γ/ml in darkness. 3: 3 mg/ml in light. 4: 3 mg/ml in darkness. 5: 5 mg/ml in light. 6: 5 mg/ml in darkness.

Fig. 2. a. Splitting curves of ATP solutions of diverse concentration in light at 0° C. 1: 50 γ/ml. 2: 500 γ/ml. 3: 2500 γ/ml. 4: 5000 γ/ml. 5: 10 000 γ/ml. 6: 100 000 γ/ml. 7: 1000 γ/ml.

Fig. 2. b. Spectrograms of ATP solutions of diverse concentration in light at 0° C. Legend as in Fig. 2. a.

Fig. 3. a. ATP of diverse dilutions after standing for 48 hours in light at 0° C. 1: 50 γ/ml. 2: 250 γ/ml. 3: 5000 γ/ml. 4: 1000 γ/ml. 5: 10 000 γ/ml.

Fig. 3. b. Spectrograms of ATP of diverse dilutions after standing for 48 hours in light at 0° C. Legend as in Fig. 3. a.

Fig. 4. a. Enzymatic splitting of ATP solutions of diverse concentrations (measured simultaneously) after standing for 72 hours at 0° C in light and in darkness. f = in light, s = in darkness. 1: 50 γ/ml. 2: 1 mg/ml. 3: 10 mg/ml. 4: 100 mg/ml.

Fig. 4. b. Enzymatic splitting of ATP solutions of diverse concentration (measured simultaneously) after standing for 72 hours at 40° C in light and in darkness. Legend as in Fig. 4. a.

Table 1. Ultraviolet absorption spectrogram values of ATP solutions of diverse concentration after standing in light and in darkness for diverse periods at 0° C. (1) Taken immediately after

preparation. (2) Extinction after standing for 24, 48 and 72 hours, respectively. The values in the first vertical column indicate the corresponding curves of Fig. 1. a.

Table 2. Ultraviolet spectrogram values of ATP solutions of diverse concentration after standing at 0 °C for 168 hours in light and in darkness. The values in the first vertical column indicate the corresponding curves of Fig. 1. b.

Die reversible Veränderung von Adenosintriphosphat in einer wässerigen Lösung unter dem Einfluss von Sonnenlicht

K. GARAY und I. G. FEHÉR

Biochemische Abteilung des Agrochemischen Forschungsinstituts, Budapest

Zusammenfassung

ATP-Lösungen verschiedener Konzentration wurden in eiskaltem Wasser im Sonnenlicht, bzw. in künstlichem Licht und Dunkelheit aufbewahrt, dann wurde das Mass der Enzymspaltung mittels eines Ostwald'schen Viscosimeters bestimmt, ferner die Spektrogramme aufgenommen und auch die Menge des anorganischen Phosphors und Ammoniaks ermittelt.

Ein wesentlicher Unterschied zeigte sich zwischen Spaltbarkeit durch Enzyme und Spektrogramme. Eine verstärkte Enzymspaltbarkeit war auch hier mit niedrigeren Extinktionswerten verbunden, während eine verhinderte Spaltbarkeit zu vergrösserten Extinktionswerten führte.

Nach der Meinung der Verfasser wird die Spaltbarkeit von ATP mit vergrößernder Konzentration darum immer mehr verhindert, weil die Aktivitätentropie sich vergrösserte. Diese Vergrößerung der Aktivitätentropie wird von Associationsformen von ATP hervorgerufen, die in verschiedener Weise und in verschiedenem Masse gebildet werden. Die Aktiven Zentren von ATP und zwar die Phosphat-Ester Bindungen werden dadurch für Enzyme sehr schwer zugänglich.

Die Vergrößerung der Extinktion wird von den Verfassern damit erklärt, dass die Extinktion des Absorptionsmaximums im Adenin mit vergrößernder Konzentration sich infolge einer verstärkten Absonderung der *trans*-gerichteten Ladung verstärkt. Die bei Kurzwellen beobachtete Extinktionsvergrößerung, sowie die sich bei den 230 Millimikron kürzeren Wellen zeichnende Absorption kann durch die Mulliken'sche Theorie gut erklärt werden.

Abb. 1/a. Spaltbarkeitskurven von ATP-Lösungen verschiedener Konzentration nach 24, 48 und 72 Stunden Stehenlassen. 1: 50 γ /ml, im Sonnenlicht. 2: 50 γ /ml in Dunkelheit. 3: 50 γ /ml im Sonnenlicht, 0 Stunden lang. 4: 50 γ /ml im Sonnenlicht. 5: 50 mg/ml in Dunkelheit 11 Stunden lang. 6: 50 mg/ml in Dunkelheit.

Abb. 1/b. Spaltbarkeitskurven von ATP-Lösungen verschiedener Konzentration nach 168 Stunden Stehenlassen. 1: 50 γ /ml im Sonnenlicht. 2: 50 γ /ml in Dunkelheit. 3: 3 mg/ml im Sonnenlicht. 4: 3 mg/ml in Dunkelheit. 5: 5 mg/ml im Sonnenlicht. 6: 5 mg/ml in Dunkelheit.

Abb. 2/a. Spaltbarkeitskurven von ATP-Lösungen verschiedener Konzentration bei 0° im Sonnenlicht. 1: 50 γ /ml. 2: 500 γ /ml. 3: 2500 γ /ml. 4: 5000 γ /ml. 5: 10 000 γ /ml. 6: 100 000 γ /ml. 7: 1000 γ /ml.

Abb. 2/b. Spektrogramme von ATP-Lösungen verschiedener Konzentration bei 0° im Sonnenlicht. Bezeichnungen s. Abb. 2/a.

Abb. 3/a. ATP verschiedener Konzentration nach 48 Stunden Stehenlassen bei 0° im Sonnenlicht. 1: 50 γ /ml. 2: 250 γ /ml. 3: 5000 γ /ml. 4: 1000 γ /ml. 5: 10 000 γ /ml.

Abb. 3/b. Spektrogramme von ATP-Lösungen verschiedener Konzentration nach 48 Stunden Stehenlassen bei 0° im Sonnenlicht. Für Bezeichnungen s. Abb. 3/a.

Abb. 4/a. Enzymspaltbarkeit von ATP-Lösungen verschiedener Konzentration (beobachtet in den gleichen Zeitpunkten), nach 72 Stunden Stehenlassen bei 0° im Sonnenlicht, bzw. in Dunkelheit. f: im Sonnenlicht, s: in Dunkelheit. 1: 50 γ /ml. 2: 1 mg/ml. 3: 10 mg/ml. 4: 100 mg/ml.

Abb. 4/b. Enzymspaltbarkeit von ATP-Lösungen verschiedener Konzentration (beobachtet in den gleichen Zeitpunkten), nach 72 Stunden Stehenlassen bei 40° C im Sonnenlicht, bzw. in Dunkelheit. Für Bezeichnungen s. Abb. 4/a.

Tabelle 1. Spektrogrammwerte ultravioletter Absorption in ATP-Lösungen verschiedener Konzentration, bei 0° verschieden lang im Sonnenlicht, bzw. in Dunkelheit gehalten. 1. Extinktion, gemessen Unmittelbar nach dem Präparieren. 2. Extinktion, gemessen nach 24, 48, bzw. 72 Stunden Stehenlassen. Die Zahlen der ersten vertikalen Kolonne bezeichnen die entsprechenden Kurven der Abb. 1/a.

Tabelle 2. Spektrogrammwerte ultravioletter Absorption in ATP-Lösungen verschiedener Konzentration, bei 0° 168 Stunden lang im Sonnenlicht, bzw. in Dunkelheit gehalten. Die Zahlen der ersten vertikalen Kolonne bezeichnen die entsprechenden Kurven der Abb. 1/b.

Transformation reversible de l'ATP dans solution aqueuse sous l'influence de la lumière solaire

K. GARAY et I. G. FEHÉR

Section biochimique de l'Institut des Recherches Agronomiques, Budapest

Résumé

Les auteurs ont exposés, pendant un certain temps, à la lumière du jour, ou à une illumination artificielle ou à l'obscurité, respectivement, des solutions d'ATP de différentes concentrations. Ils ont déterminé à l'aide du viscosimètre Ostwald le degré de la fissibilité enzymatique dans ces solutions, ils en ont fait des spectrogrammes et ont aussi dosé leur teneur en acide phosphorique et en ammoniacque.

Ils ont pu constater une différence substantielle entre la fissibilité enzymatique et les spectrogrammes. Une fissibilité enzymatique accrue avait pour corollaire la diminution de l'extinction, la fissibilité restreinte était accompagnée de l'augmentation de l'extinction.

A leur avis la fissibilité de l'ATP est devenue plus difficile avec l'augmentation de la concentration parce que l'entropie de l'activation est devenue plus grande. L'augmentation de l'entropie de l'activation a été causé par les formes associatives de l'ATP formées de plusieurs facons et à plusieurs degrés. Ainsi les centres actifs de l'ATP, les liaisons d'ester phosphaté, sont devenus difficilement attaquables par l'enzyme.

Quand à l'augmentation de l'extinction, les auteurs sont d'avis que dans l'adénine l'extinction du maximum d'adsorption augmente avec l'augmentation de la concentration par suite de l'augmentation de la séparation de la charge de la direction trans. — L'augmentation de l'extinction observée vers les ondes plus courtes, ainsi que l'accroissement très fort vers les ondes plus courtes à 250 millimicrons, trouve son explication dans la théorie de Mulliken.

Explication des figures et des tableaux voir en langue allemande et anglaise.